

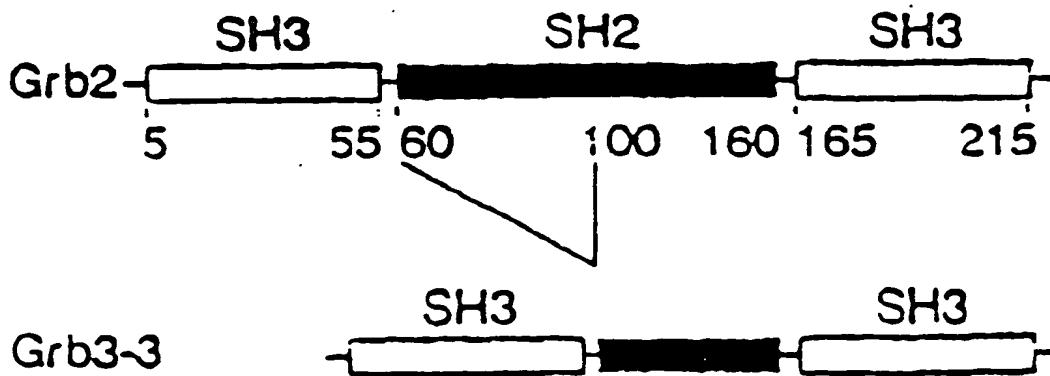


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, A61K 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/07981 (43) Date de publication internationale: 23 mars 1995 (23.03.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00542 (22) Date de dépôt international: 9 mai 1994 (09.05.94)		(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Données relatives à la priorité: 93/10971 15 septembre 1993 (15.09.93) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 53, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 259, boulevard Péreire, F-75017 Paris (FR).			
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			

(54) Title: GRB3-3 GENE, VARIANTS AND USES THEREOF

(54) Titre: GENE GRB3-3, SES VARIANTES ET LEURS UTILISATIONS



(57) Abstract

Novel gene known as Grb3-3, variants thereof and use especially in anti-cancer gene therapy.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un nouveau gène, désigné Grb3-3, ses variantes et leurs utilisations, notamment en thérapie génique anti-cancéreuse.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

GENE GRB3-3, SES VARIANTS ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne un nouveau gène, désigné Grb3-3, ses variants, et leurs utilisations, notamment en thérapie génique anti-cancéreuse.

Différents gènes, appelés oncogènes et gènes suppresseurs, sont impliqués dans le contrôle de la division cellulaire. Parmi ceux-ci, les gènes ras, et leurs produits généralement désignés protéines p21, jouent un rôle clé dans le contrôle de la prolifération cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Notamment, il a été montré que certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogénique. Ainsi, un grand nombre de tumeurs humaines a été associé à la présence de gènes ras modifiés. De même, une surexpression de ces protéines p21 peut conduire à un dérèglement de la prolifération cellulaire. La compréhension du rôle exact de ces protéines p21 dans les cellules, de leur mode de fonctionnement et de leurs caractéristiques constitue donc un enjeu majeur pour la compréhension et l'approche thérapeutique de la cancérogénèse.

Différents facteurs impliqués dans la voie de signalisation ras dépendante ont été identifiés. Parmi ceux-ci figure le gène Grb2, qui code pour une protéine de 23-25 kDa ayant une structure SH3-SH2-SH3 (Lowenstein et al., Cell 70 (1992) 431; Matuoka et al., PNAS 89 (1992) 9015). Le produit du gène Grb2 semble interagir avec les protéines tyrosine phosphorylées, par son domaine SH2, et avec un facteur d'échange du GDP de la classe SOS, par son domaine SH3 (Egan et al., Nature 363 (1993) 45). Il serait ainsi l'un des composants de l'activité transformante du produit du gène ras. La présente invention découle de la mise en évidence, du clonage et de la caractérisation d'un isoforme du gène Grb2, désigné Grb3-3, possédant une délétion dans le domaine SH2. Ce gène est exprimé dans les tissus adultes : l'ARNm correspondant est présent sous une bande unique de 1,5 kb, et est traduit en une protéine de 19 kDa. En raison de sa délétion dans le domaine SH2, le produit du gène Grb3-3 n'est plus capable d'interagir avec les protéines tyrosine phosphorylées (récepteur EGF phosphorylé), mais il conserve la capacité d'interagir avec les domaines riche en proline des protéines SOS. En raison de sa délétion, le produit du gène Grb3-3 est ainsi capable de s'opposer aux effets cellulaires du produit du gène Grb2. Le transfert de ce gène *in vivo*, ou de variants de celui-ci, y compris de

séquences antisens, permet donc d'interférer avec les processus de prolifération, de différenciation et/ou de mort cellulaire.

Un premier objet de l'invention concerne donc une séquence nucléotidique comprenant tout ou partie du gène Grb3-3 (séquence SEQ ID n° 1).

5 Un autre objet de l'invention concerne une séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID n° 1 et capable d'inhiber au moins en partie l'expression de la protéine Grb2 ou Grb3-3. En particulier, l'invention concerne les séquences antisens, dont l'expression dans une cellule cible permet de contrôler la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrrites, dans la cellule
10 cible, en ARN complémentaires des ARNm cellulaires Grb2 ou Grb3-3 et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie de la séquence nucléiques SEQ ID n° 1, transcrrites dans l'orientation inverse.

15 Comme indiqué ci-avant, Grb2 est une protéine au moins bi-fonctionnelle, s'ancrant par son domaine SH2 à des séquences particulières phosphorylées en tyrosine, et, par ses deux domaines SH3, aux facteurs d'échange de la famille SOS. Grb3-3 ayant perdu sa capacité à s'associer à des protéines phosphorylées en tyrosine peut donc uniquement former un complexe avec les protéines SOS. Grb3-3 peut donc s'opposer au recrutement du complexe Grb2-SOS par les récepteurs des facteurs de
20 croissance autophosphorylés ou par des protéines associées également phosphorylées en tyrosine telles que SHC ou IRS1. Grb3-3 étant capable de bloquer ce recrutement, il est capable de bloquer des voies mitogènes et d'induire la mort cellulaire. La demanderesse a en effet démontré que la protéine Grb3-3 était exprimée au cours de certains processus physiologiques comme par exemple la maturation du thymus chez
25 le rat. La demanderesse a également montré que Grb3-3 est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose de différents types cellulaires. Ces propriétés tout à fait avantageuses ont pu être mises en évidence (i) par injection de la protéine recombinante dans les fibroblastes 3T3 et (ii) par transfert de la séquence codant pour Grb3-3 dans les cellules 3T3 (exemple 4). Grb3-3 est donc capable d'induire la mort cellulaire de cellules viables telles que des cellules immortalisées, cancéreuses ou embryonnaires. Comme montré dans les exemples, Grb2 est capable de s'opposer aux effets de Grb3-3.

Par ailleurs, une recherche de l'expression de Grb3-3 réalisée au cours de l'infection de cellules lymphocytaires par le virus HIV a permis de montrer que la production virale massive observée 7 jours après l'infection est corrélée avec une surexpression de l'ARNm de Grb3-3 par les cellules infectées (exemple 5). Cette 5 expérience montre que éliminer ou contrecarrer les effets cellulaires de Grb3-3 peut également permettre de maintenir en vie des cellules infectées, notamment par le VIH, et ainsi, permettre aux lymphocytes T4 de continuer à remplir un rôle de défense immunitaire. A cet égard, l'invention concerne également l'utilisation de composés capables d'éliminer ou de contrecarrer au moins partiellement les effets 10 cellulaires de Grb3-3 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée traitement du Sida. Plus particulièrement, les composés utilisés peuvent être :

- des séquences antisens génétiques telles que définies ci-dessus,
- des oligonucléotides spécifiques de Grb3-3, modifiés ou non pour une meilleure stabilité ou biodisponibilité (phosphorothioates, agents intercalants, etc). Il 15 peut s'agir de préférence d'oligonucléotides recouvrant la séquence codante localisée entre le domaine SH3 N-terminal et le domaine SH2 résiduel.
- toute séquence dont le transfert dans les cellules infectées induit une surexpression de Grb2.

Les séquences nucléiques selon l'invention peuvent être utilisées telles quelles, 20 par exemple après injection à l'homme ou l'animal, pour induire une protection ou traiter les cancers. En particulier, elles peuvent être injectées sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092. Elles peuvent également être administrées sous forme complexée, par exemple avec du DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 25 (1989) 375), avec des lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), sous forme de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

Préférentiellement, les séquences nucléiques selon l'invention font partie d'un vecteur. L'emploi d'un tel vecteur permet en effet d'améliorer l'administration de l'acide nucléique dans les cellules à traiter, et également d'augmenter sa stabilité dans lesdites 30 cellules, ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable. De plus, il est possible d'introduire plusieurs séquences d'acide nucléique dans un même vecteur, ce qui augmente également l'efficacité du traitement.

Le vecteur utilisé peut être d'origine diverse, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules tumorales humaines. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés (AAV), le virus de l'herpès, le cytomégalovirus (CMV), le virus de la vaccine, etc. Des vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus, ou des AAV incorporant des séquences d'acides nucléiques hétérologues ont été décrits dans la littérature [Akli et al., *Nature Genetics* 3 (1993) 224 ; Stratford-Perricaudet et al., *Human Gene Therapy* 1 (1990) 241 ; EP 185 573, Levrero et al., *Gene* 101 (1991) 195 ; Le Gal la Salle et al., *Science* 259 (1993) 988 ; Roemer et Friedmann, *Eur. J. Biochem.* 208 (1992) 211 ; Dobson et al., *Neuron* 5 (1990) 353 ; Chiocca et al., *New Biol.* 2 (1990) 739 ; Miyanozawa et al., *New Biol.* 4 (1992) 238 ; WO91/18088].

La présente invention concerne donc également tout virus recombinant comprenant, insérée dans son génome, une séquence nucléique telle que définie avant.

Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réPLICATION dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par l'acide nucléique de l'invention. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de l'invention sous forme incorporée à un adénovirus, un AAV ou un rétrovirus recombinant défectif.

Concernant les adénovirus, il en existe différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Par ailleurs, ces virus ne s'intègrent pas dans le génome des cellules qu'ils infectent, et peuvent incorporer des fragments importants d'ADN exogène. Parmi les différents sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la réPLICATION sont les régions E1A et E1B.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémenter la partie du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460).

Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un virus recombinant ou une séquence nucléotidique tels que définis ci-dessus.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable, éventuellement directement dans la tumeur à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses d'acides nucléiques (séquence ou vecteur) utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, de l'acide nucléique à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une

manière générale, concernant les virus recombinants selon l'invention, ceux-ci sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

De telles compositions pharmaceutiques peuvent être utilisées chez l'homme, pour le traitement et/ou la prévention des cancers. En particulier, les produits de l'invention étant capables de moduler l'activité des protéines ras, ils permettent d'intervenir dans le processus de développement des cancers, et notamment, ils peuvent inhiber l'activité des oncogènes dont l'activité transformante passe par une interaction p21-GAP fonctionnelle. De nombreux cancers ont en effet été associés à la présence de protéines ras oncogéniques. Parmi les cancers renfermant le plus souvent des gènes ras mutés, on peut citer notamment les adénocarcinomes du pancréas, dont 90 % ont un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549), les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50 %), ou les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30 %, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682). Plus généralement, les compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour traiter tout type de pathologie dans lesquelles un prolifération cellulaire anormale est observée, par induction de l'apoptose, ainsi que toute pathologie caractérisée par une mort cellulaire par apoptose (sida, chorée de Huntington, Parkinson), au moyen de composés bloquant les effets de Grb3-3 (antisens notamment).

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des Figures

Figure 1 : Représentation schématique des domaines structuraux de Grb2 et Grb3-3.

Figure 2 : Etude de la liaison de Grb3-3 au récepteur à l'EGF (figure 2a) et à des peptides riches en proline (figure 2b).

Figure 3 : Effet de Grb3-3 sur la transactivation par ras d'un RRE dérivé de l'enhancer du virus du polyome.

Figure 4 : Mise en évidence de la mort cellulaire induite par Grb3-3 sur les fibroblastes 3T3.

Figure 5 : Mise en évidence de l'expression de Grb3-3 dans les cellules infectées par le virus HIV.

5 Techniques Générales de Biologie Moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli, etc... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondament décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Falloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être

effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

EXEMPLES

1. Isolement du gène Grb3-3

Le gène Grb3-3 a été isolé par criblage d'une banque d'ADN humain au moyen d'une sonde dérivée de la séquence du gène Grb2.

500 000 phages recombinants Lambda gt11 portant des fragments d'ADN issus d'une banque de placenta humaine (Clontech) ont été criblés au moyen d'une sonde dérivée de la séquence du gène Grb2. La sonde utilisée correspond aux 8 premiers acides aminés de la protéine Grb2, et possède la séquence suivante :

ATGGAAGCCATCGCCAAATATGAC (SEQ ID n° 2)

10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999

La capacité de liaison de Grb3-3 a été étudiée en utilisant des protéines de fusion à la Glutathion-S-Transférase (GST), biotinylées. Ce type de fusion permet une purification rapide et efficace des produits recombinants. Pour cela, les séquences de l'invention ont été exprimées dans la souche d'*E.coli* TG1 sous forme de protéines de fusion avec la GST selon la technique décrite par Smith et Johnson [Gene 67 (1988) 31]. Brièvement, les gènes Grb2 et Grb3-3 ont tout d'abord été modifiés par introduction de part et d'autre des codons start et stop d'un site BamHI. Pour cela, les phases ouvertes de lecture de ces gènes ont été amplifiées par PCR au moyen des oligonucléotides suivants :

10 Oligonucléotide I (5') (SEQ ID n° 3) :

GAATTCGGATCCATGGAAGCCATGCCAAATATGACTTC

Oligonucléotide II (3') (SEQ ID n° 4) :

GAATTCGGATCTTAGACGTTCCGGTTCACGGGGTGAC

15 La partie soulignée correspond au site BamHI créé, suivi ou précédé des codons start et stop.

Les gènes ainsi amplifiés ont ensuite été clonés sous forme de fragments BamHI dans le vecteur pGEX 2T (Pharmacia) linéarisé par le même enzyme, en 3' et en phase d'un ADNc codant pour la GST. Les vecteurs ainsi obtenus ont ensuite été utilisés pour transformer la souche *E.coli* TG1. Les cellules ainsi transformées ont été 20 précultivées une nuit à 37°C, diluées au 1/10e dans du milieu LB, ajoutées d'IPTG pour induire l'expression (2 heures, 25°C), puis cultivées 21 heures environ à 25°C. Les cellules ont ensuite été lysées, et les protéines de fusions produites purifiées par 25 affinité sur colonne Agarose-GSH. Pour cela, le lysat bactérien est incubé en présence du gel (préparé et équilibré avec le tampon de lyse) pendant 15 minutes à 4°C. Après 3 lavages avec un tampon Tris-HCl pH 7,4, les protéines sont élues en présence d'un tampon Tris-HCl pH 7,7 contenant un excès de GST. Le surnageant est récolté et centrifugé.

Le même protocole a été utilisé pour préparer un mutant de Grb2 dans lequel 30 la glycine 203 est remplacée par une arginine (Grb2G203R) et un mutant de Grb3-3 dans lequel la glycine 162 est remplacée par une arginine (Grb3-3G162R). Le mutant Grb2G203R a été décrit comme n'ayant plus d'activité dans un test de réinitiation de la synthèse d'ADN (Lowenstein et al précitée). Le mutant Grb3-3G162R porte la même mutation sur la même position, et devrait donc également être inactif.

Ces mutants ont été préparés par mutagénèse par PCR sur les gènes Grb2 et Grb3-3 en utilisant, en 5', l'oligonucléotide I décrit ci-dessus, et en 3', l'oligonucléotide III suivant sur lequel le codon muté est souligné :

Oligonucléotide III (3') (SEQ ID n° 5) :

5 GACGTTCCGGTTCACGGGGTGACATAATTGCGGGGAAACATGCGGGTC

Les fragments ainsi amplifiés ont ensuite été élués, réamplifiés par PCR au moyen des oligonucléotides I et II, puis clonés dans le vecteur pGEX 2T. Les mutants ont ensuite été produits comme décrit ci-dessus.

10 Les protéines de fusion à la GST (GST-Grb2, GST-Grb3-3, GST-Grb3-3G162R et la GST) ont ensuite été biotinylées par les techniques classiques connues de l'homme du métier (Cf techniques générales de biologie moléculaire ainsi que Mayer et al., PNAS 88 (1991) 627), et utilisées comme sondes pour déterminer la liaison au récepteur à l'EGF phosphorylé immobilisé (2.1.) puis à un peptide dérivé de hSOS1 (2.2.).

15 2.1. Liaison au récepteur EGF phosphorylé

Protocole : Le récepteur à l'EGF utilisé a été purifié à partir de cellules A431 par immobilisation sur WGA-sépharose selon la technique décrite par Duchesne et al. (Science 259 (1993) 525). 2 µg de ce récepteur ont d'abord été stimulés par 1 µM EGF, 10 min. à 22°C, puis incubés, avec ou sans ATP froid (10 µM), en présence de 20 2,5 mM MnCl₂ dans un tampon HNTG (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton, 10 % Glycérol, pH=7,5) à 4°C pendant 2 min. La phosphorylation du récepteur est ensuite stoppée par addition d'un tampon de dégradation. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE 4-20 % puis transférés sur des membranes de polyvinylgdène difluorure (PVDF). Les blots ont ensuite été incubés en présence des 25 différentes fusions GST biotinylées (2 µg/ml), puis révélés au moyen de streptavidine couplée à la phosphatase alkaline (Promega). Les récepteurs EGF ont également été soumis à un immunoblot en présence d'anticorps anti-phosphotyrosines (anti--PY) pour vérifier que les récepteurs ont bien été phosphorylés.

30 Résultats : Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2a. Ils montrent, comme attendu, que la protéine Grb2 interagit avec le récepteur EGF sous forme phosphorylée seulement. Ils montrent ensuite que la protéine Grb3-3 ne lie pas le récepteur EGF, quel que soit son degré de phosphorylation.

2.2. Liaison à un peptide dérivé de hSOS1

Protocole : Les deux peptides riches en proline suivants ont été synthétisés :

Peptide hSOS1 : GTPEVPVPPPVP_nRRRPESA : Ce peptide correspond aux résidus

1143 à 1162 de la protéine hSOS1 (Li et al., Nature 363 (1993) 83), responsable de

5 l'interaction entre Grb2 et hSOS1 (SEQ ID n° 6).

Peptide 3BP1 : PPPLPPLV : Ce peptide est dérivé de la protéine 3BP1, qui est connue pour lier de manière efficace le domaine SH3 de Abl et Src (Cicchetti et al., Science 257 (1992) 803) (SEQ ID n° 7).

Chacun de ces peptides (1 µl, 10 mg/ml) a été immobilisé sur membrane de 10 nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été incubées dans un tampon bloquant (Tris 20 mM pH=7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween, 3 % albumine bovine). Les membranes ont ensuite été incubées une nuit à 4°C en présence des différentes fusions GST biotinylées (4 µg/ml), puis révélées au moyen de streptavidine couplée à la phosphatase alkaline (Promega)

15 Résultats : Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2b. Ils montrent que Grb3-3, comme Grb2, est capable de lier le peptide hSOS1. Ils montrent de plus que cette interaction est spécifique puisqu'aucune liaison n'est observée avec le peptide 3BP1. Par ailleurs, les résultats montrent également que le mutant Grb3-3G162R n'est plus capable de lier le peptide hSOS1, ce qui confirme l'importance de ce résidu et le 20 rôle fonctionnel de cette interaction.

3. Activité de la protéine Grb3-3

Cet exemple démontre que, en dépit de sa délétion dans le domaine SH2, la protéine Grb3-3 possède un effet fonctionnel.

25 L'activité de la protéine Grb3-3 a été étudié par détermination de sa capacité à coopérer avec ras pour la transactivation d'un promoteur possédant des éléments de réponse à ras (RRE), et gouvernant l'expression d'un gène reporteur.

Le protocole utilisé a été décrit par exemple dans Schweighoffer et al., Science 256 (1992) 825. Brièvement, le promoteur utilisé est un promoteur synthétique composé du promoteur murin du gène de la thymidine kinase et de 4 éléments PEA1 répétés dérivés de l'enhancer du polyôme (Waslyk et al., EMBO J. 7 (1988) 2475) : promoteur Py-TK. Ce promoteur dirige l'expression du gène reporteur,

en l'occurrence du gène bactérien de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) : vecteur Py-TK-CAT. Les vecteurs d'expression des gènes testés ont été construits par insertion desdits gènes, sous forme de fragments BamHI, au site BglII du plasmide pSV2. Ce site permet de placer les gènes sous contrôle du promoteur précoce SV40.

5 Des cellules ER22 à 40% de confluence ont été transfectées avec 0,5 µg du vecteur Py-TK-CAT seul (Py) ou en présence de du vecteur d'expression portant, sous contrôle du promoteur précoce de SV40, le gène : Grb2, 2 µg, Grb3-3, 2 µg, Grb2(G203R) 2 µg, Grb3-3(G162R) 2 µg, ou Grb3-3, 2 µg + Grb2, 2 µg. Dans chaque cas, la quantité totale d'ADN a été ajustée à 5 µg avec un vecteur d'expression
10 sans insert. La transfection a été effectuée en présence de lipospermine (Transfectam, IBF-Sepracor). Les cellules ont été maintenues 48 heures en culture dans un milieu DMEM supplémenté par 0,5 % serum de veau fétal. L'activité CAT (transactivation du RRE) a ensuite été déterminée comme décrit par Wasylyk et al (PNAS 85 (1988) 7952).

15 Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3. Ils montrent clairement que l'expression de la protéine Grb3-3 s'oppose aux effets de l'activation d'un récepteur à facteur de croissance. Ils montrent également que Grb2 en excès s'oppose aux effets de Grb3-3 sur la réponse au facteur de croissance.

4. Grb3-3 induit l'apoptose cellulaire

20 Cet exemple démontre l'implication directe de Grb3-3 dans l'apoptose cellulaire. Cette propriété offre des applications particulièrement avantageuses pour le traitement des pathologies résultant d'une prolifération cellulaire (cancers, resténose, etc.).

25 L'induction de l'apoptose cellulaire par Grb3-3 a été démontrée (i) par injection de la protéine recombinante dans les fibroblastes 3T3 et (ii) par transfert de la séquence codant pour Grb3-3 dans les cellules 3T3.

(i) Injection de la protéine recombinante

30 La protéine Grb3-3 recombinante a été préparée sous forme de protéine de fusion avec la GST selon le protocole décrit dans l'exemple 2. La protéine de fusion a ensuite été traitée par la thrombine (0,25%, Sigma) pour séparer la partie GST, puis purifiée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne monoQ. Les fractions

contenant la protéine recombinante ont ensuite été concentrées au moyen de microconcentreurs Microsep (Filtron) dans un tampon phosphate 20 mM (pH 7) contenant 100 mM NaCl. La protéine purifiée ainsi obtenue a été injectée (1 à 3 mg/ml) à des cellules 3T3 en culture au moyen d'un microinjecteur automatique 5 Eppendorf. Les cellules ont ensuite été incubées à 34°C et photographiées à intervalles réguliers pour suivre les transformations morphologiques. Les résultats obtenus montrent que 5 heures après l'injection de Grb3-3 la majeure partie des cellules sont mortes alors que l'injection dans les mêmes conditions de Grb2 ou du mutant Grb3-3 (G162R) n'a aucun effet sur la viabilité des cellules.

10 (ii) Transfert de la séquence codant pour la protéine recombinante

Un plasmide a été construit comprenant la séquence SEQ ID n° 1 codant pour la protéine Grb3-3 sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40.

Les fibroblastes 3T3 à 40 % de confluence ont été transfectés en présence de lipospermine (Transfectam, IBF-Sepracor) avec 0,5 ou 2 µg de ce plasmide 15 d'expression. 48 heures après la transfection, 50% des cellules étaient en suspension dans le milieu, et les cellules restantes, adhérant à la paroi, présentaient des changements morphologiques très importants (figure 4). Une analyse par électrophorèse en gel d'agarose a montré par ailleurs que les cellules présentaient un pattern de fragmentation d'ADN oligo-nucléosomal caractéristique des cellules mortes 20 (figure 4). En revanche, les cellules transfectées dans les mêmes conditions par un plasmide d'expression de Grb2, Grb3-3 (G162R) ou Grb2 (G203R) conservent une morphologie normale, sont toujours viables et ne présentent aucune fragmentation d'ADN. Comme le montre la figure 4, la co-expression de Grb2 permet de s'opposer aux effets de Grb3-3.

25 Ces résultats montrent donc clairement que Grb3-3 constitue un gène tueur capable d'induire l'apoptose cellulaire. Comme indiqué ci-dessus, cette propriété offre des applications particulièrement avantageuses pour le traitement des pathologies résultant d'une prolifération cellulaire telles que notamment les cancers, la resténose, etc.

30 5. Mise en évidence de l'expression de Grb3-3 dans les lymphocytes infectés par le virus HIV.

Cet exemple montre que, au cours du cycle d'infection des lymphocytes T par le virus HIV, la proportion relative des ARNm de Grb2 et Grb3-3 est modifiée, et que le messager de Grb3-3 est surexprimé au moment de la production virale massive et de la mort cellulaire.

- 5 Des lymphocytes du sang périphérique ont été infectés par le virus HIV-1 à deux dilutions (1/10 et 1/100) pendant 1, 4 ou 7 jours. Les ARNm des cellules ont ensuite été analysés par reverse-PCR au moyen d'oligonucléotides spécifiques de Grb2 et Grb3-3 pour déterminer la proportion relative des messagers de Grb2 et Grb3-3. Les oligonucléotides spécifiques de Grb3-3 utilisés sont les suivants :
- 10 Oligonucléotide IV (3') : ATCGTTCCAAACGGATGTGGTTT (SEQ ID n° 8)
Oligonucléotide V (5') : ATAGAAATGAAACCACATCCGTTT (SEQ ID n° 9)

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 5. Ils montrent clairement que 7 jours après l'infection par le virus HIV, l'ARNm de Grb3-3 est surexprimé. Comme montré par dosage de la protéine p24 et de la transcriptase inverse du virus, le 15 jour 7 correspond également à la période à laquelle une production virale massive est observée.

LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATION GENERALE:

- (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 (D) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: Gene Grb3-3, ses variants et leurs utilisations.

15 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 9

- (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
 (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 933 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Homo sapiens

- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 37..567

45 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Grb3-3"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

50	GAATTGGGG CTGCTGAGCA CTGAGCAGGG CTCAGA ATG GAA GCC ATC GCC AAA Met Glu Ala Ile Ala Lys	54
55	TAT GAC TTC AAA GCT ACT GCA GAC GAC GAC CTG AGC TTC AAA AGG GGG Tyr Asp Phe Lys Ala Thr Ala Asp Asp Asp Leu Ser Phe Lys Arg Gly	102
60	GAC ATC CTC AAG GTT TTG AAC GAA GAA TGT GAT CAG AAC TGG TAC AAG Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Glu Glu Cys Asp Gln Asn Trp Tyr Lys	150
	GCA GAG CTT AAT GGA AAA GAC GGC TTC ATT CCC AAG AAC TAC ATA GAA Ala Glu Leu Asn Gly Lys Asp Gly Phe Ile Pro Lys Asn Tyr Ile Glu	198

	40	45	50	
5	ATG AAA CCA CAT CCG TTT GGA AAC GAT GTG CAG CAC TTC AAG GTG CTC Met Lys Pro His Pro Phe Gly Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Leu 55 60 65 70			246
10	CGA GAT GGA GCC GGG AAG TAC TTC CTC TGG GTG GTG AAG TTC AAT TCT Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser 75 80 85			294
15	TTG AAT GAG CTG GTG GAT TAT CAC AGA TCT ACA TCT GTC TCC AGA AAC Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn 90 95 100			342
20	CAG CAG ATA TTC CTG CGG GAC ATA GAA CAG GTG CCA CAG CAG CCG ACA Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro Thr 105 110 115			390
25	TAC GTC CAG GCC CTC TTT GAC TTT GAT CCC CAG GAG GAT GGA GAG CTG Tyr Val Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asp Pro Gln Glu Asp Gly Glu Leu 120 125 130			438
30	GGC TTC CGC CGG GGA GAT TTT ATC CAT GTC ATG GAT AAC TCA GAC CCC Gly Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp Asn Ser Asp Pro 135 140 145 150			486
35	AAC TGG TGG AAA GGA GCT TGC CAC GGG CAG ACC GGC ATG TTT CCC CGC Asn Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly Met Phe Pro Arg 155 160 165			534
40	AAT TAT GTC ACC CCC GTG AAC CGG AAC GTC TAAGAGTCAA GAAGCAATTAA Asn Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val 170 175			584
45	TTTAAAGAAA GTGAAAAATG TAAAACACAT ACAAAAGAAT TAAACCCACA AGCTGCCTCT GACAGCAGCC TGTGAGGGAG TGCAGAACAC CTGCCGGTC ACCCTGTGAC CCTCTCACTT TGGTTGGAAC TTTAGGGGGT GGGAGGGGGC GTTGGATTTA AAAATGCCAA AACTTACCTA TAAATTAAGA AGAGTTTTA TTACAAATTTC TCACTGCTGC TCCTCTTCC CCTCCTTTGT CTTTTTTTTC TTCCTTTTT CTCTTCTGTC CATCAGTGCA TGACGTTAA GGCCACGTAT AGTCCTAGCT GACGCCAATA AAAACAAAGA AACCAAAAAA CCCGAATTC			644
				704
				764
				824
				884
				933

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- 50 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
 55 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE I
- 15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:
 GAATTCGGAT CCATGGAAGC CATGCCAAA TATGACTTC

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE II
- 25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:
 GAATTCGGAT CCTTAGACGT TCCGGTTCAC GGGGGTGAC

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 49 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE III
- 35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:
 GACGTTCCGG TTCACGGGG TGACATAATT GCGGGGAAAC ATGCGGGTC

49

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 40 (ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine
 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Peptide hSOS1 (résidus 1143 à 1162)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Gly Thr Pro Glu Val Pro Val Pro Pro Val Pro Pro Arg Arg Arg

1 5 10 15

Pro Glu Ser Ala

5 20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 8 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Peptide 3BP1

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Pro Pro Pro Leu Pro Pro Leu Val

1 5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE IV

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

ATCGTTCCA AACGGATGTG GTTT

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(vi) ORIGINE:

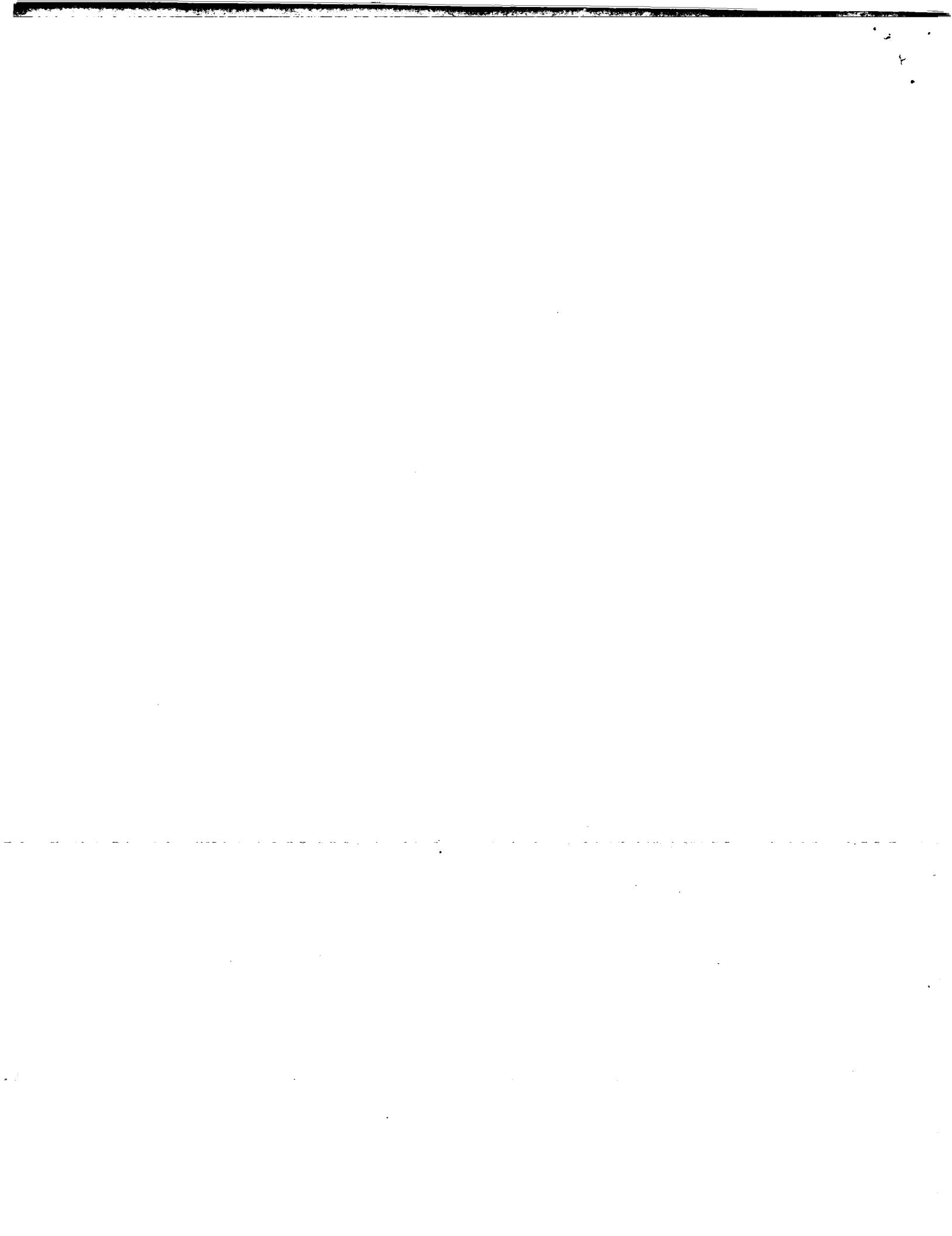
- (A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE V

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:
ATAGAAATGA AACCACATCC GTTT

24

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1.
2. Séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID n° 1 et capable d'inhiber au moins en partie l'expression de la protéine Grb2 ou Grb3-3.
3. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon les revendications 1 ou 2.
4. Vecteur selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.
- 10 5. Vecteur selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur dérivé des adénovirus, des rétrovirus, des AAV, du virus HSV, CMV ou du virus de la vaccine.
6. Vecteur selon les revendications 4 ou 5 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus défectif pour la réPLICATION.
- 15 7. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs vecteurs selon l'une des revendications 3 à 6.
8. Composition pharmaceutique comprenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon les revendications 1 ou 2, sous forme complexée à du DEAE-dextran, à des protéines nucléaires ou à des lipides, sous forme brute ou encore 20 incorporée à des liposomes.
9. Utilisation d'une séquence selon la revendication 1 ou 2 ou d'un vecteur contenant ladite séquence pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
- 25 10. Utilisation d'un composé capable d'éliminer ou de contrecarrer au moins partiellement les effets cellulaires de Grb3-3 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée traitement du Sida.



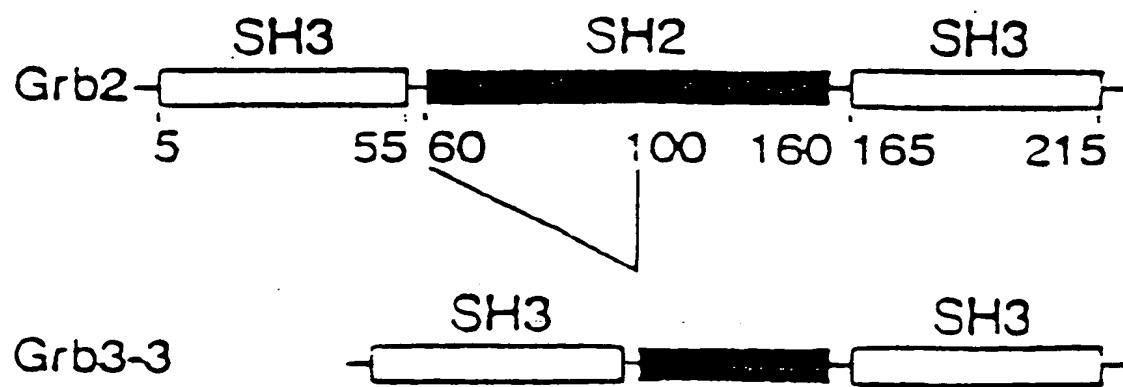


Figure 1



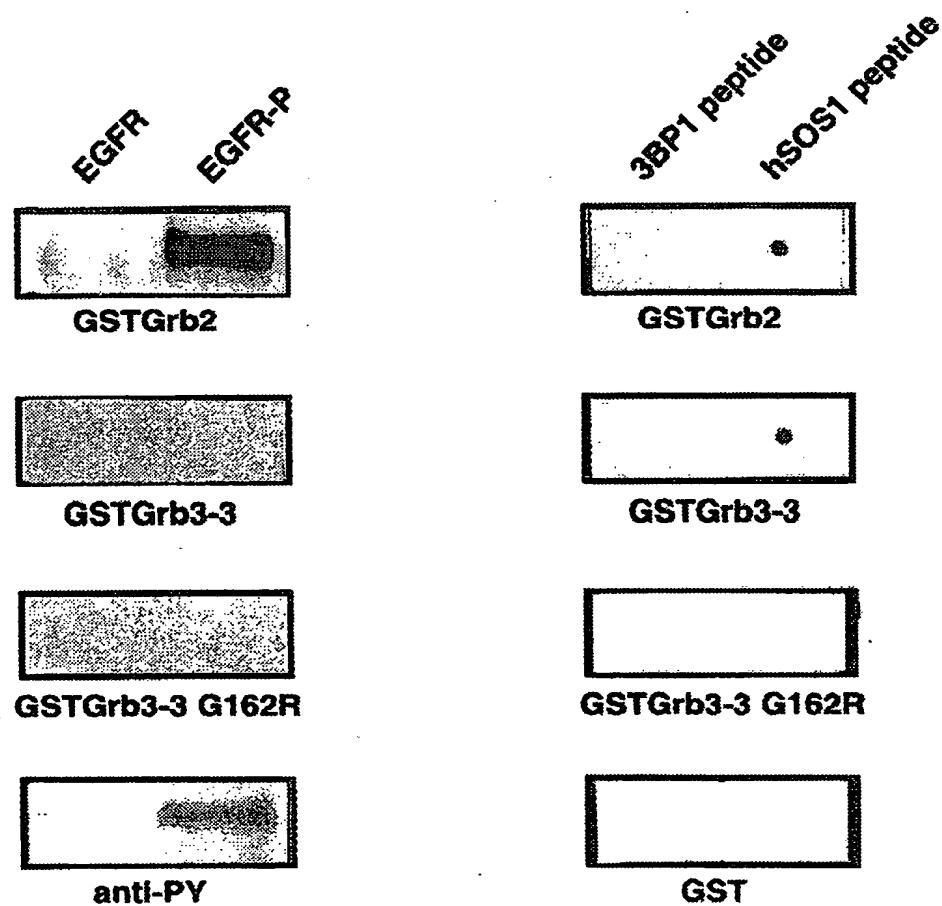


Figure 2



3/5

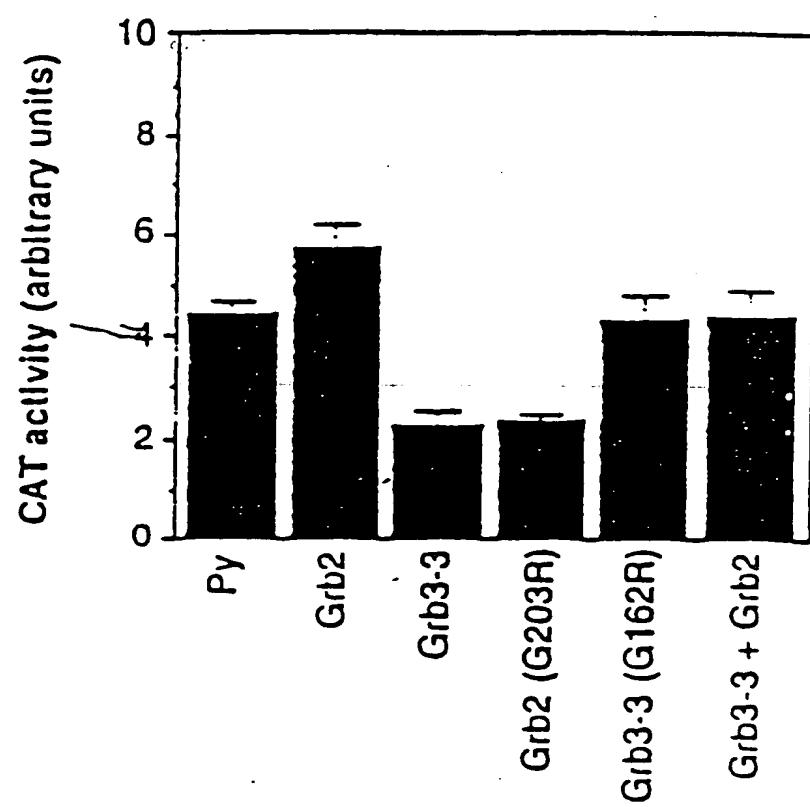
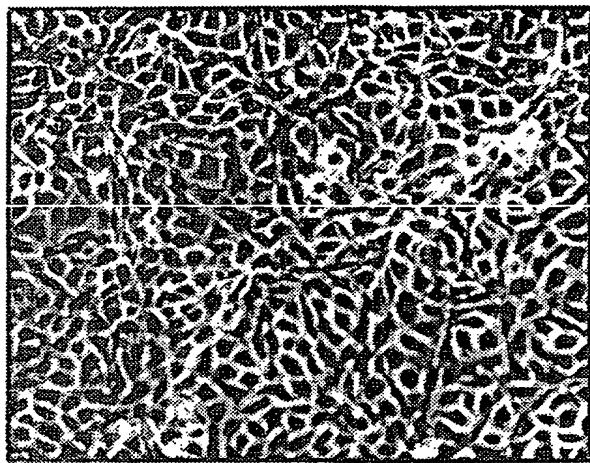
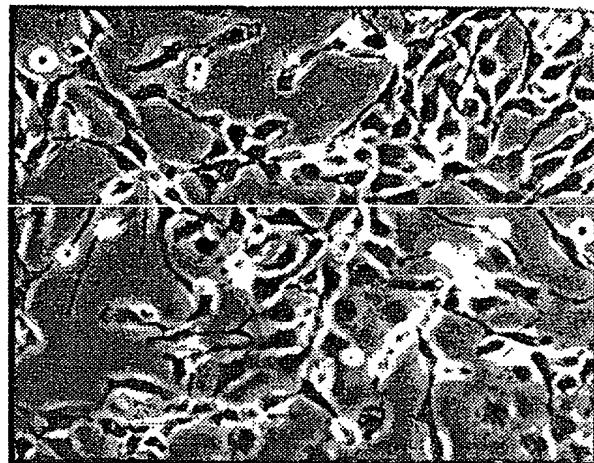


Figure 3

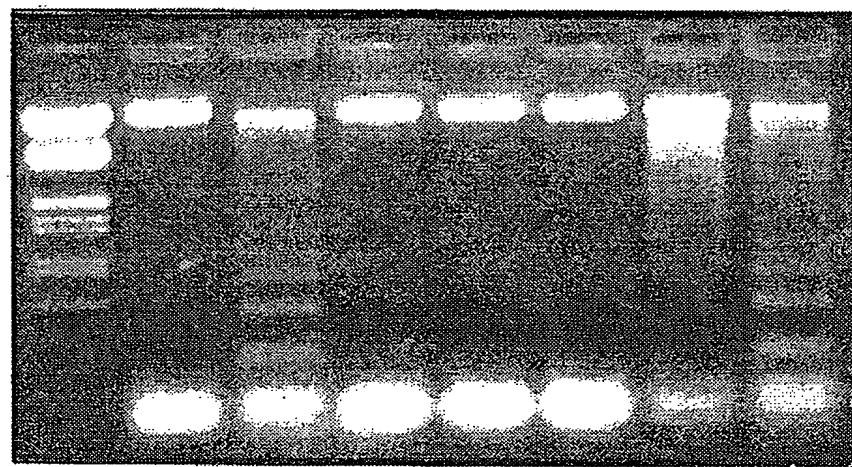




NIH3T3



+Grb3-3



Marker
NIH3T3
+Grb2
+Grb3-3
+Grb2 G203R
+Grb3-3 G162R
+Grb3-3
+Grb2 G203R

Figure 4



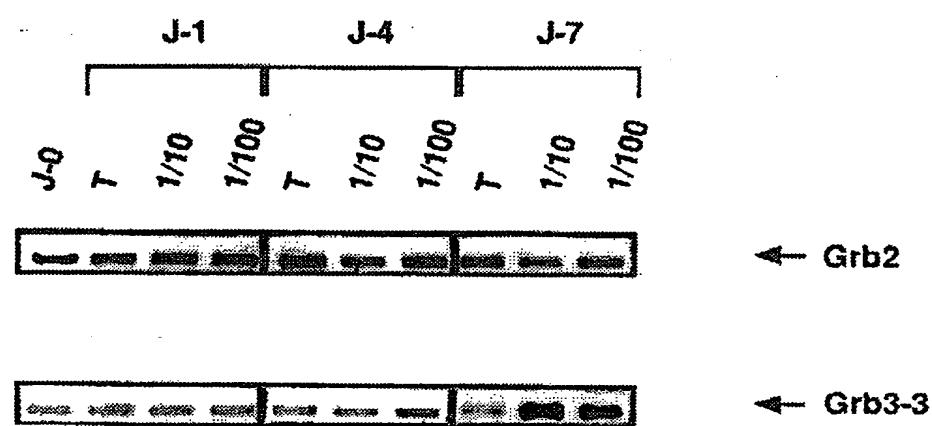


Figure 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No

PCT/FR 94/00542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>SCIENCE vol. 264, no. 5161 , 13 May 1994 , LANCASTER, PA US pages 971 - 974 FATH, I. ET AL. 'Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties' see the whole document</p> <p>---</p>	1
A	<p>NATURE. vol. 363 , 6 May 1993 , LONDON GB pages 45 - 51 EGAN, S.E. ET AL. 'Association of SOS Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation' cited in the application see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

6 September 1994

27. 09. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CELL. vol. 70 , 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 431 - 442 LOWENSTEIN, E.J. ET AL. 'The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling' cited in the application see the whole document ---	1
A	SCIENCE vol. 259, no. 5094 , 22 January 1993 , LANCASTER, PA US pages 525 - 528 DUCHESNE, M. ET AL. 'Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling' see the whole document ---	1
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 13 , 1993 pages 5500 - 5512 SUEN, K. ET AL. 'Molecular cloning of the mouse Grb2 gene : differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptor' cited in the application see the whole document ---	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89 , 1992 , WASHINGTON US pages 9015 - 9019 MATUOKA, K. ET AL. see the whole document ---	1
T	WO,A,94 07913 (WARNER LAMBERT CO.) 14 April 1994 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00542

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9407913	14-04-94	AU-B- 5136093	26-04-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. de Internationale No
PCT/FR 94/00542

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistées
T	SCIENCE vol. 264, no. 5161 , 13 Mai 1994 , LANCASTER, PA US pages 971 - 974 FATH, I. ET AL. 'Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties' voir le document en entier --- NATURE. vol. 363 , 6 Mai 1993 , LONDON GB pages 45 - 51 EGAN, S.E. ET AL. 'Association of SOS Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation' cité dans la demande voir le document en entier --- -/-/	1
A		1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *M* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

6 Septembre 1994

27. 09. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. .e Internationale No
PCT/FR 94/00542

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CELL. vol. 70 , 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 431 - 442 LOWENSTEIN, E.J. ET AL. 'The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling' cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>SCIENCE vol. 259, no. 5094 , 22 Janvier 1993 , LANCASTER, PA US pages 525 - 528 DUCHESNE, M. ET AL. 'Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling' voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 13 , 1993 pages 5500 - 5512 SUEN, K. ET AL. 'Molecular cloning of the mouse Grb2 gene : differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptor' cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89 , 1992 , WASHINGTON US pages 9015 - 9019 MATUOKA, K. ET AL. voir le document en entier ---</p>	1
T	<p>WO,A,94 07913 (WARNER LAMBERT CO.) 14 Avril 1994 voir le document en entier -----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 94/00542

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9407913	14-04-94	AU-B- 5136093	26-04-94